

IMPACTO DE TRES DIETAS BASADAS EN FORRAJES, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN *BOS TAURUS* (BOVIDAE)*

Juan Sebastián Albarracín Z¹, Francisco Javier Henao U², Julián Estrada Á³

Resumen

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios del Instituto de Biotecnología Agropecuaria y en la Granja Tesorito de la Universidad de Caldas. Para este experimento se utilizaron nueve bovinos de levante de 200 kg de peso vivo, divididos en tres grupos a los cuales se les suministró pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) más 0, 15 y 30% de concentrado comercial, utilizando para ello un diseño experimental de bloques completos al azar; la variable independiente fue el nivel de suplementación, la variable de bloqueo fue la fecha de iniciación de cada replicación, y la unidad experimental correspondió a un grupo de tres animales. Por punción ruminal directa se tomó metano (CH₄) y ácidos grasos volátiles (AGV) en tubos vacutainer® de 7 ml por duplicado. Dichas muestras se analizaron por las técnicas de cromatografía de gases con detección de ionización de llama GC/FID y cromatografía gaseosa acoplada a espectrofotometría de masas GC/MS. Con las condiciones cromatográficas determinadas en laboratorio, se observaron los diferentes tiempos de retención de los compuestos volátiles: CH₄ (1.865 min), ácido propiónico (3.141 min), ácido acético (2.281 min) y ácido butírico (4.387). En este experimento no se observaron diferencias (NS) entre los tres tratamientos. Para la ganancia de peso no se encontraron diferencias (NS) entre los tratamientos.

Palabras Clave: metano, ácidos grasos volátiles, cromatografía, bovinos suplementados.

IMPACT OF THREE FORAGE BASED DIETS ON THE PRODUCTION OF METHANE AND VOLATILE FATTY ACIDS IN *BOS TAURUS* (BOVIDAE)

Abstract

This research was carried out in the Agricultural Biotechnology Institute laboratories and in the Tesorito farm from Universidad de Caldas. Nine raise cattle about 200 Kg were used in this experiment, divided into three groups which were fed with Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) in addition to 0, 15 and 30% commercial concentrate food using an experimental design of randomized complete blocks. The independent variable was the level of supplementation, the blocking variable was the date of initiation of each replication, and the experimental unit was a group of three animals. Methane (CH₄) and volatile fatty acids (VFA) were taken through direct ruminal puncture in 7 ml vacutainer® tubes in duplicate. These samples were analyzed through gas chromatography techniques with flame ionization

* FR: 14-II-2012. FA: 15-III-2013.

¹ Estudiante de la Maestría en Sistemas de Producción Agropecuaria. Grupo Biología de la producción Pecuaria. Instituto de Biotecnología Agropecuaria. Universidad de Caldas.

² Instituto de Biotecnología Agropecuaria. Grupo Biotecnología Agropecuaria. Universidad de Caldas. Manizales, Caldas, Colombia. Autor para correspondencia. E-mail fhenaou@ucaldas.edu.co. Apartado aéreo 275 Manizales, Colombia. Telefax (576) 8781500 extensión 15661.

detection GC/FID and gaseous chromatography coupled with mass spectrometry GC/MS. With the chromatographic conditions determined in the laboratory, different retention times of volatile compounds were observed: CH₄ (1.865 min) propionic acid (3.141 min) acetic acid (2.281 min) and butyric acid (4.387). In this experiment differences (NS) between the three treatments were not observed. Differences (NS) for weight gain between treatments were not found.

Key words: methane, volatile fatty acids, chromatography, supplemented cattle.

INTRODUCCIÓN

Los bovinos fisiológicamente cuentan con un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso de las pasturas con altos contenidos de carbohidratos estructurales (CE), en alimentos de alta calidad como la carne y la leche; sin embargo, este mismo sistema digestivo también produce gases como CH₄ y dióxido de carbono (CO₂), que causan efecto invernadero, ocasionando aproximadamente el 18% del calentamiento global (MONTENEGRO & ABARCA, 2000).

CARMONA *et al.* (2005), señalan que el CH₄ es considerado un signo de ineficiencia en la utilización de la energía en rumiantes; y se determina como la relación acético:propiónico; adicionalmente VAN SOEST (1994); JOHNSON & JOHNSON (1995) señalan que los alimentos ricos en fibra (CE) fermentados en rumen, muestran aumentos tanto en la producción de ácido acético, como en las pérdidas de energía en forma de CH₄. La pérdida de energía representada en producción de CH₄ puede estudiarse mediante el conocimiento de la energía metabolizable, es decir, la energía del alimento menos la energía perdida por emisión de estos gases en donde mayoritariamente se encuentra el CH₄ (MENDOZA *et al.*, 2008).

MOE & TYRELL (1979), muestran las relaciones existentes entre el tipo de carbohidrato suministrado y la producción de CH₄, en donde un carbohidrato como la celulosa es más digerible que la hemicelulosa. RODRIGUEZ & VALENCIA (2008) señalan que la producción de CH₄ se debe a un grupo de bacterias metanogénicas anaeróbicas (grupo *Archaea*) que fermentan la glucosa a ácido acético y reducen el CO₂ hasta CH₄.

En el rumen, estas bacterias están sujetas a un pH cercano a 7; estado óptimo para producción de CH₄ (CHURCH, 1993). Ellas muestran diferencias en cuanto a su pared celular y los lípidos intracelulares, existiendo diferentes especies como: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanomicrobium mobile* (BLANCO & RIVERA, 1999). Las bacterias metanogénicas son un grupo especial dentro de la población ruminal por su papel en la regulación de hidrogeniones (H₂); ya que al mantener baja la concentración de este elemento se promueve el crecimiento de otras especies bacterianas y permiten una fermentación más eficaz (YOKOYAMA & JOHNSON, 1993).

Se reporta que el 87% de la producción de CH₄ se da en el rumen y el resto en el tracto digestivo posterior, la mayoría de este gas es absorbido por la sangre y llevado a los pulmones en donde es eliminado a través de la boca y los orificios nasales (MCCAUGHEY *et al.*, 1999). Estimativos de producción de CH₄ en los países en vía

de desarrollo, muestran producciones de aproximadamente 55 kg/A/año, muy por encima de los 35 kg/A/año registrados en países desarrollados (KINSMAN *et al.*, 1995), este fenómeno se debe fundamentalmente a la mayor cantidad de fibra existente en las gramíneas tropicales (VAN SOEST, 1994).

Experimentos realizados en España por CALSAMIGLIA *et al.* (2009), encontraron una alta interacción entre el pH y las dietas suministradas, donde la adición de concentrados hasta un 40% disminuyó el pH y se aumentó la producción de ácido propiónico, lo cual condujo a la disminución en la formación de CH₄ en el animal. LILA *et al.* (2003), utilizaron concentrados a base de Saponinas 35 (grasa, fibra cruda, carbohidratos y ceniza) en un ambiente ruminal *in vitro* con dietas de almidón de maíz y algodón, encontrándose aumento en el ácido propiónico, disminuyendo así la relación de estos dos compuestos vitales en la formación de CH₄. Adicionalmente, dietas con forraje de alfalfa y el ensilajes de maíz mezclados con concentrados, mostraron resultados positivos en disminuciones de CH₄ (HOLTER & YOUNG, 1992).

Cromatografía de gases para determinación de compuestos volátiles

El primer trabajo donde se utilizó la técnica de cromatografía data de 1951. Esta técnica, descrita por MARTIN Y JAMES (1952), es en la actualidad un método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles como AGV y CH₄ (GUTIÉRREZ & DROGUET, 2002). Mediante esta técnica se ingresa la muestra en solución a puerto de inyección donde se volatiliza y es arrastrada a través de la columna cromatográfica por el gas de arrastre, permitiendo la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (GUTIÉRREZ & DROGUET, 2002; PEÑALVER, 2002).

El objetivo de esta investigación fue analizar el impacto de diferentes dietas basadas en forrajes, sobre la producción de CH₄ y AGV en el rumen; además de implementar alternativas de medición de estos compuestos volátiles a través de técnicas cromatográficas.

METODOLOGÍA

En los laboratorios del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y en la Granja Tesorito de la Universidad de Caldas, se llevó a cabo la presente investigación. Antes de la fase experimental, se desarrollaron ajustes a la metodología a emplear para la determinación de los compuestos volátiles del rumen, mediante varias pruebas ensayo error en un animal experimental, a este animal se le extrajo varias veces muestra del rumen (punción directa en ijar izquierda) para ser analizada; inmediatamente después de su toma se llevó al laboratorio de instrumentación analítica para su proceso, utilizando para ello métodos cromatográficos y así determinar los compuestos volátiles de nuestro interés. Creadas estas condiciones se inició la fase experimental en la granja tesorito, utilizando para ello nueve animales bovinos $\frac{3}{4}$ (F1xCebú) a los cuales se les suministró tres dietas (0, 15 y 30% de concentrado comercial) con base en una pastura de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) durante 21 días experimentales (14 de acostumbamiento y 7 de medición); durante los días de muestreo se tomaron 4 mediciones (días 15, 17, 19 y 21). Los nueve bovinos experimentales se pesaron y sortearon en tres grupos (0, 15 y 30%), se tomaron pesajes al inicio y al final de la fase experimental para cada

replica; los animales en los 21 días experimentales (14 de acostumbramiento - 7 de medición) recibieron pastoreo más suplementación individual en comederos, inmediatamente después de la suplementación se procedió a la toma de las muestras por punción ruminal directa (ijar izquierdo), con un tubo al vacío (vacutainer®) de 7 ml, acoplado a una camisa con aguja calibre 14; las muestras se realizaron por duplicado, las cuales fueron llevadas al laboratorio mediante una nevera portátil. En el laboratorio se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a masas marca Shimadzu QP 2010 plus®, equipado con una columna HP 5 (Fenilmetilxilano) y automuestreador AOC 20I para la determinación de AGV de cadena corta; y un cromatógrafo de gases marca HP 6890® con detector de ionización de llama para la determinación de CH₄; generando la base de datos de producción de los diferentes compuestos volátiles; se utilizó una jeringa de 10 µl marca Hamilton® en un modo de inyección directa al cromatógrafo en el punto de inyección; el tiempo requerido para el procesamiento de cada muestra fueron de 20 minutos. Las condiciones descritas son: método Split con división de flujo, modo de inyección de 25:1, temperatura puerto de inyección 250°C, presión 11.32 Kilopascales (Kpa), flujo total 23.1 milímetros/ minuto (ml/min), gas de arrastre empleado nitrógeno grado 5 (99.999% pureza), columna capilar HP 5 (Fenilmetilxilano) de 30 metros (mt) longitud, 0.25 ml de diámetro y 0.50 micrometros (µm) de recubrimiento interno.

Los resultados experimentales se analizaron en un diseño de bloques completos al azar (variable independiente nivel de suplementación, variable de bloqueo fecha de iniciación de cada replica). El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante análisis de varianza y comparaciones múltiples con el programa Stata® versión 12.

RESULTADOS

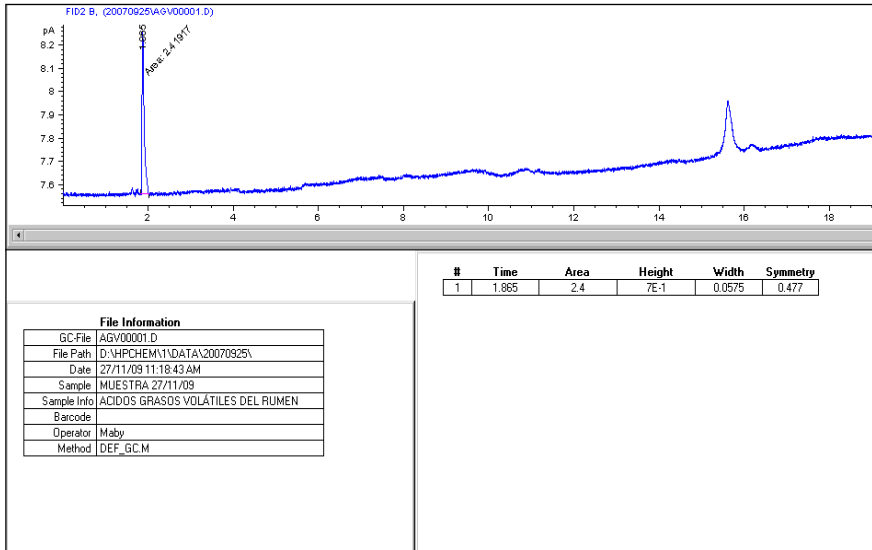
Las condiciones cromatográficas para la determinación de CH₄ en el cromatógrafo de gases son descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para detección de CH₄ y AGV

° C / min	Temperatura aproximada	Minutos del proceso	Tiempo ejecutado
-	40	2.0	2.0
10	110	2.0	10.0
5	150	2.0	20.0
-	200	2.0	22.0

Cuando se ingresan cantidades pequeñas (6 ml) al cromatógrafo, estas son difíciles de medir, fenómeno que ocurre con el CH₄ (compuesto altamente volátil), por lo cual se hizo necesario la utilización de muestra procedente de un biodigestor de producción de cerdos con el fin de corroborar el tiempo exacto de detección del CH₄. También se encontró que al aumentar la cantidad de muestra inyectada en el cromatógrafo (10ml) existía un error debido a la saturación de la columna y por consiguiente una pérdida de la muestra.

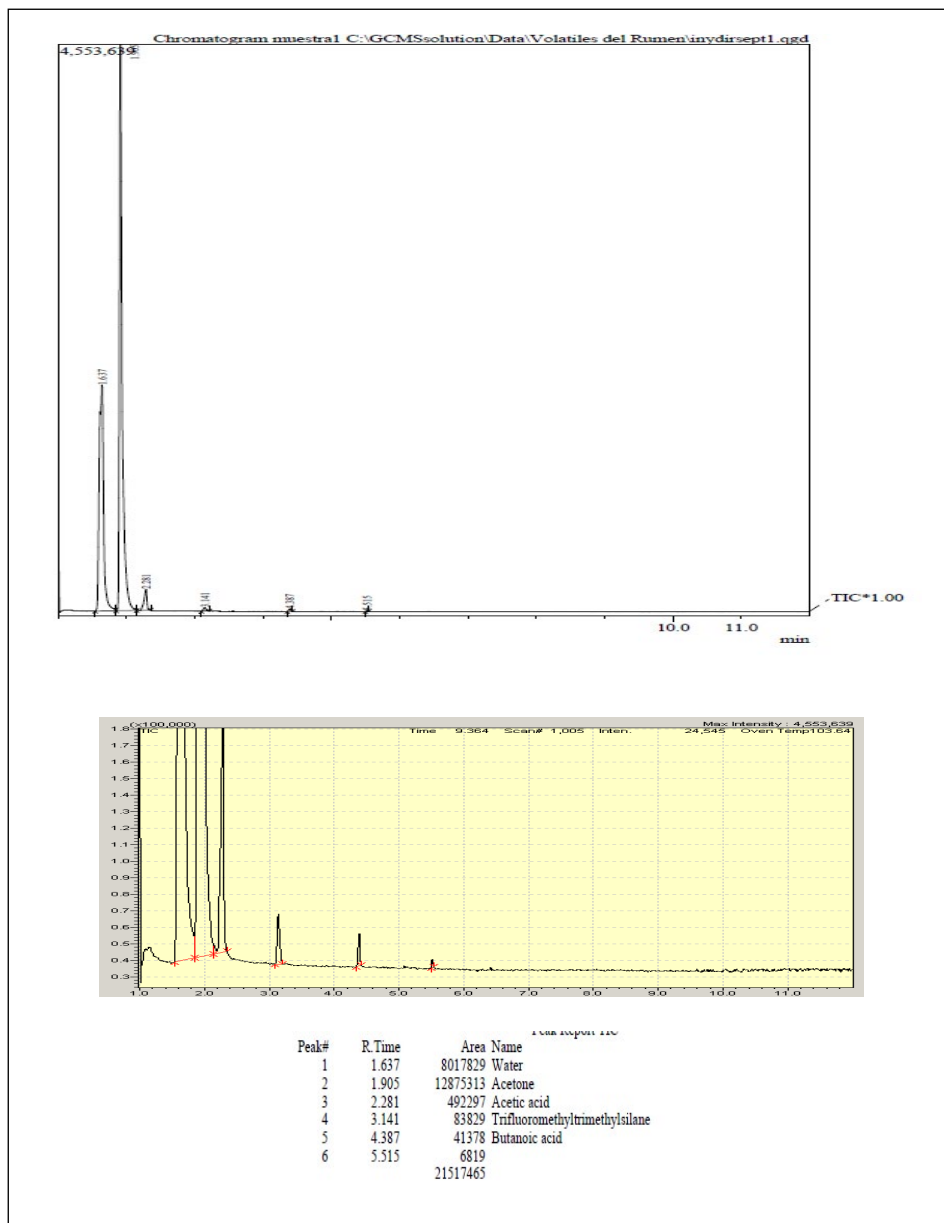
Con las condiciones cromatográficas determinadas en laboratorio, el tiempo de retención del CH_4 se observa en la gráfica 1.



Gráfica 1. Cromatograma con tiempo de retención de CH_4 (Tiempo de retención: 1.865 min) mediante cromatografía de gases.

El tiempo de retención del ácido propiónico bajo nuestras condiciones ocurre muy lentamente; por ello fue necesaria la utilización de patrones puros para comprobar su identificación. El tiempo de retención del ácido acético es muy similar al CH_4 influyendo notablemente en el análisis, también fue necesario la utilización de patrones puros de este compuesto para la identificación del mismo bajo nuestras condiciones. El ultimo compuesto volátil en ser analizado por el cromatógrafo es el ácido butírico, con la ayuda de un patrón puro se pudo determinar con certeza su tiempo de retención e identificación por el cromatógrafo.

Realizado el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas (NS) entre las tres dietas suministradas, tanto para CH_4 como para los AGV; sin embargo, en otros estudios donde se evaluó la interacción pH y cantidad de concentrados en la dieta (hasta un 40%), el pH disminuye y el ácido propiónico se aumentó, bajando la formación de CH_4 en el animal (CALSAMIGLIA *et al.*, 2009). Adicionalmente, la producción de CH_4 en bovinos se centra en la relación existente entre acético y propiónico, en donde existen variaciones dependiendo de la dieta (JOHNSON & JOHNSON, 1995).



Gráfica 2. Cromatograma con tiempo de retención del ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.

Tabla 2. Resultados análisis de CH₄ en laboratorio

Tratamiento	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio
0%	793,7847	335,8036	247,9366	459,1750
15%	199,4092	589,1617	1763,4710	850,6807
30%	1100,5000	990,2897	484,6183	858,4694

Por otra parte, para la variable dependiente ganancia de peso no se observaron diferencias significativas (NS) entre las 3 dietas (0.59 kg sin suplemento, 0.60 kg con 15% y 0.68 kg con 30% de suplemento).

Otros investigadores JOHNSON & JOHNSON (1995); MCCAUGHEY *et al.* (1998); DERAMUS *et al.* (2003); GRAINGER *et al.* (2007), han utilizado la técnica de SF₆ (hexafluoruro de azufre), para la cuantificación del CH₄, debido a que esta técnica determina entre el 93-98% del total de CH₄ producido, comparado con las cámaras de respiración. Sin embargo las técnicas anteriores hace necesario contar con una gran infraestructura y tienen un alto costo.

DISCUSIÓN

La implementación de las técnicas cromatográficas para la cuantificación de CH₄ y AGV es una herramienta útil; los tiempos de retención, los rangos de temperatura y los cambios de flujo son de vital importancia para el normal funcionamiento del cromatógrafo. Los tiempos de retención de estos compuestos están sujetos a las condiciones establecidas en laboratorio. La cuantificación de los compuestos está directamente relacionada con el volumen de la muestra y la capacidad de soporte de la columna para no ocasionar saturaciones. Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten recalcar la importancia que tiene la realización de nuevas alternativas de separación de estos compuestos, con la finalidad de encontrar alternativas que generen menos riesgos para las personas.

En posteriores investigaciones se recomienda tener en cuenta el tiempo necesario que debe transcurrir entre el momento del suministro del suplemento, hasta la toma del gas por punción, debido que se debe garantizar una buena fermentación ruminal para tomar las muestras respectivas. Para una mayor efectividad en la determinación y cuantificación del CH₄ y los AGV, es indispensable implementar un estándar interno para el CH₄ y una técnica de derivatización para los AGV de cadena corta.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas por la financiación del presente proyecto al primer autor y al Instituto de Biotecnología Agropecuaria por el suministro de todos los elementos necesarios para llevarlo a cabo.

BIBLIOGRAFÍA

- BLANCO, M.R. & RIVERA, O.E., 1999. - Adhesión microbiana en el rumen. Sitio Argentino de Producción Animal.
- CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P.W.; FERRET, A.; BACH, A., 2009. - Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Ani. Sci* 86: 702-711.
- CARMONA, J.C.; BOLÍVAR, D.M.; GIRALDO, L.A., 2005. - El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18(1): 49- 63.
- CHURCH, D.C., 1983. - El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. 1ed. Acribia. Prentice Halla.
- DERAMUS, H.A.; CLEMENT, T.C.; GIAMPOLA, D.D.; DICKISON, P.C., 2003. - Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *J. Environ. Qual.*, 32: 269-277.
- GRAINGER, C.; CLARKE, T.; MCGINN, S.M.; AULDIST, M.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; HANNAH, M.C.; WAGHORN, G.C.; CLARK, H. ECKARD, R.J., 2007. -Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF6) Tracer and Chamber Techniques. *J. Dairy. Sci* 90(6):2755-2766.
- GUTIÉRREZ, M.C. & DROGUET, M., 2002. - La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos de mal olor. *Boletín Intexter. UPC*, n.122, pp. 35-41.
- HOLTER, J.B y YOUNG, A.J., 1992. - Methane prediction in dry and lactating holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 75: 2165-2175.
- JOHNSON, K.A. & JOHNSON, D.E., 1995. - Methane emissions from cattle. *J. Animal Sci.* 73: 2483-2492.
- KINSMAN, R.; SAUER, F.D.; JACKSON, H.A.; WOLYNETZ, M.S., 1995. - Methane and Carbon Dioxide emissions from dairy cows in full lactation monitored over a six month period. *J. Dairy. Sci.* 78: 2760-2766.
- LILA, Z.A.; MOHAMMED, N.; KANDA, S.; KAMADA, T.; ITABASHI, H., 2003. - Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *J. Dairy. Sci.* 86: 3330-3336.
- MCCAUGHEY, W.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN, D., 1999. - Impact of pasture type on methane production by lacting beef cows. *J. Anim. Sci.* 79(2): 221-226.
- MENDOZA, G.D.; PLATA, F.X.; ESPINOSA, R.; LARA, A., 2008. - Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. *Universidad y Ciencia* 24(1): 75-87.
- MOE, P.W & TYRRELL, H.F., 1979. - Methane production in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 62: 1583-1586.
- MONTENEGRO, J. & ABARCA, S., 2000. - Fijación de carbono, emisión de CH₄ y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: *Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales*. CATIE- FAO - SIDE. Ed. Nuestra Tierra.
- PEÑALVER, A.M., 2002. - Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Tarragona, España. Universitat Rovira Virgili.
- RODRÍGUEZ, A.A.; VALENCIA, E., 2008. - Ruminantia. *UPRM* 3(1): 1-4.
- VAN SOEST, P.J., 1994. - Nutritional ecology of the ruminant. 2ed. Ithaca. Cornell University Press.
- YOKOYAMA, M.T & JOHNSON, K.A., 1993. - Microbiología del rumen e intestino. En: Church D.C: *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia S.A., España.